

Azotobacter の生理學的研究に就て

(日本學術協會報告 第四卷 昭和三年 五五五頁 發表)

農學博士 板 野 新 夫

緒 言

人生と密接な關係を有する窒素問題に就いて近來遊離窒素の利用方法が工業的に多大の發展を來してゐるが、別に生物學方面に於てもこの遊離窒素を固定し得る微生物の研究が逐次進められて來た。

就中著者は *Azotobacter* の生理學的研究に興味を有してゐるので、此處に既報された研究者の業績を討檢し、且つ著者の希望を述べ併せて著者の實驗成績に就いて報告したいと思ふ。

尙該問題は單に土壤微生物學上ののみならず、一般生物學上に涉つて重要な事項に屬してゐるので今後諸種の立場より攻究されん事を望む次第である。

Azotobacter の生理學的研究の現狀

土壤中に遊離窒素固定作用を有する細菌が棲息するものは Berthelot(1885)⁽¹⁾ に依つて實證されたが後 Beijerinck(1901)⁽²⁾ は最も該機能の優秀なる *Azotobacter* 類の純粹分離に成功した。夫れ以來該菌の生理的作用に關する事項は諸種の方面より重要視さるるに至つた。即ち該菌の有する固定作用を研究することに依つて窒素代謝機能の生理的説明

を得ることが可能なからである。

併して今此等従来の研究業績を大別すれば凡そ次の如き種に分ち得らるると思ふ。

一、エネルギー又は熱力學的考察 (Thermodynamical consideration)

二、環境的考察 (Environmental consideration)

三、窒素固定の機構 (Mechanism) 及び固定窒素の形態

一、第一項のエネルギー又は熱力學的考察に關しては Winogradsky (1893)⁽³⁾ が Glucose の消費量と窒素固定量を研究して以來 Löhnis F. and K. Pillai,⁽⁴⁾ 其他に依つて多數に研究業績が報告されてゐる。

二、第一項の環境的考察に就いては之を更に次の如く分けて考察することが出来る。

a. 養養物の關係

養養物の性質を變へるにつれて窒素固定量が變化する。つて Löhnis (1908)⁽⁴⁾, Hoffmann (1910)⁽⁵⁾, Krainsky (1919)⁽⁶⁾ and others の研究に依つて確證された。

b. 濃度の關係

養養物の性質の他にこれ等有機物或は無機物塩類の濃度が固定力に影響を及ぼすのであるが、殊に無機類に就いては Christensen (1918)⁽⁷⁾ Graves (1922)⁽⁸⁾ 等の研究があり、有機物に對しては Löhnis (1908)⁽⁴⁾, Mckeridge (1915)⁽⁹⁾ 等の報告がある。又近來生理學上重要視されてゐる水素イオン濃度の關係に就いては Gainey (1918)⁽¹⁰⁾, Fred (1918)⁽¹¹⁾, Johnson (1922)⁽¹²⁾, 山縣板野 (1923)⁽¹³⁾ 等の報告があつて其何れも濃度が生理作用と密接なる關係を以つて居る。つて

明かにされてゐる。

c. 膠質との關係

近來膠質學の進歩と共に種々の土壤中の膠質が如何なる影響をするか云々研究は Remy (1911)⁽¹⁴⁾, Schünger (1913)⁽¹⁵⁾ 其他に依つて報告されてゐる。

d. 水分及び温度の關係

土壤中の水分及び温度が窒素固定作用に多大の影響あることは Lipman (1915)⁽¹⁶⁾, Löhnis (1908)⁽⁴⁾, Koch (1907)⁽¹⁷⁾ 其他に依つて研究された。

e. 光線及び放射線との關係

近來光學の進歩と共に光線及び放射線殊に紫外線等の關係に就ては Jones (1913)⁽¹⁸⁾, Kayser (1920)⁽¹⁹⁾ 其他に依つて研究された。

三、第三項の窒素固定の機序 (Mechanism) に就いては既に多數の研究が行はれたが殆ど未解決の體に残されてゐる云つて良い。若しこの點が解決されたとするならば科學上に或は實際上(農業、食料)に多大の貢獻を來たすもの云はねばならぬ。

今之等の業績を綜合すれば凡そ次の如く大別せらるると思ふ。

r. 接觸物 (Catalyser) の存在

一八九三年に Winogradsky⁽²⁰⁾ は或る種類の接觸物が細胞内に存在して居てこれによつて窒素と水素とが結合され、

アムモニヤを構成するに至るものであらうと報告したが未だその Catalyst の本體に就いては不明である。

c. Hydrogen Acceptor の存在

Wieland (1922)⁽²¹⁾ に依つて提唱された説であるが血清中に於ける Amboceptor の如きものが存在するであらうと云ふのである、が併し之も單なる假説に止つてゐる。

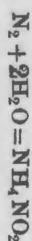
酸化説

Gautier の Drouin (1888)⁽²²⁾ が有機物の酸化に依つて水素が発生され夫れが窒素と結合してアムモニヤを構成するのだらうと唱へたが初期の培養基中に於てアムモニヤが檢出される事は認められなかつた。然るに最近 Kautsky 等⁽²³⁾ 及び其の共同研究者並に隈川と岡本⁽²⁴⁾ (本稿起稿中の報告) に依つて初期の培養基中に於いてもアムモニヤの生成することが確められた。

又 Bonnem (1903)⁽²⁵⁾ は水酸化鐵の接觸作用に依つて N_2O_3 が生成されるものであらうと論じ Ozapek (1904)⁽²⁶⁾ は NH_4NO_3 が構成されるのであらうと唱へたのである。

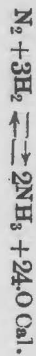
d. 水の直接化合説

Loew の麻生 (1909)⁽²⁷⁾ は之を次式の如く報告した。



以上略記した如く窒素固定の機序に關しては諸種の説が報告されたが、之を要するに窒素と水素とが化合するのか又は酸素と結合するのか、或は水素と酸素と同時に結合するのか云ふ三種類になる。今之を電子説的に考察するに窒素

の水素に對する親和力は酸素の夫れに對するよりも強力である。又之を熱力學的に考察して若し假に次の如き反應のも
とに窒素と水素とが結合するとすれば



となつて發熱反應を呈するところとなり、窒素が酸素と結合して次式の如くなることすれば



となる。之は吸熱反應なるのであるからこの點からみて寧ろ窒素が水素と結合するをみるのが可能的である。

然りとすればその結合ははたして何に依つて行はれ、如何なる方法を経て行はるものであらうか、且つ又何故にこ
の作用は他の多くの生物に依つて充分行はれないのであらうか、と云ふ疑問がある。

勿論この問題は之を單なるこの種の生物的本能と認めて學理的に不解決のものとして Grant すべきものか又現存の
科學的方法によつては最早解決の餘地なしと考ふべきであるかと云ふに、此處には尙種々の未解決の問題が残されて
る様に思ふのである。

實驗報告

以上は *Azotobacter* の生理學的研究の業績に就いてその概要を叙したのであるが次に著者の報告した實驗に關して前
年米國で Werkman (1927)⁽²⁾ に依つて疑點として指摘された所に就て説明しておきたいと思ふ。

筆者 (1923)⁽²⁾ 及び *Azot. Chroococcum* 12 Vitamin B? [Yeast Vitamin by Harris Laboratory, N. Y.] の Phyto-

nucleic acid [from Yeast Cell, by Will Corporation N.Y.] の影響に就いて実験を行い該菌の成育と窒素固定量に關してこれを表の如く報告した。

第 一 表

The influence of varying concentrations of vitamin B (?) and Phyto-nucleic acid on the growth of *Azotobacter*

Vitamin concentrate,	Growth after five days at 25° C	
	Vitamin B(?)	Phyto-nucleic acid.
1:500	++	++
1:1,000	++	++
1:10,000	++	++
1:100,000	+	+
1:1,000,000	+	+
Ashby solution (Plain)	+	+

即ち第一表に示す結果では以上二種の供試物は 10,000 分の 1 以上の濃度に於て共に刺激的效果を認め得るがその程度は濃度には比例的には見ななかつた。

第 二 表

Rate of acceration of growth.

Media.	Hours.					
	24	43	96	120	240	360

Ashby + vitamin B(?)	-	+	+	++	++	++
" + Phyto-nucleic acid.	-	+	+	++	++	++
Plain Ashby	-	+	+	+	+	+

+, moderate visible growth; ++ abundant visible growth

次に第二表を見るに之は該供試物の刺激効果の速度を示すものであるが四八時間以内に始まつて一二〇時間(五日間)に於いては既に Maximum に達してゐる。と同時に該供試物の影響は殆ど同時に觀察された。

第三表

Growth of *Azotobacter* and nitrogen fixed.

Media	Number of organisms per cc.		N. per 100 cc.		N. gained.
	Initial.	after 10 days.	Initial.	after 10 days.	
Ashby + vitamin B(?)	18,000	1,550 millions.	0.2 mgm.	15.0 mgm.	14.8 mgm.
" + phyto-nucleic acid.	-	1,250	0.2	13.0	12.3
Plain Ashby.	-	459	0.2-	5.7	5.5

第三表に示す所は菌の數並に固定窒素量を測定した結果であるが、供試物は共に顯著な効果を呈してゐて、殊に Vitamin B (?) が Phyto-nucleic acid に優つてゐることが知れた。と同時に窒素固定量は繁殖程度に比例するところがわかつた。

今之等の成績を綜合するに *Azotobacter* は 10,000 分の 1 瓦量の成物質に依つて刺激を受けその固定窒素量は約三倍

に増加するに至ることが知れる。而してこの理由は單なる栄養分の増量より來る影響でなく寧ろ或種の刺激的效果に起因するので、之は他の微生物に於ける實驗と同等の如く考へらるるのである。又窒素固定量は其繁殖程度に依つて支配される観がある。

この點に關して Warkman (1922)⁽²⁸⁾ は著者の用いた Vitamin 量は 10,000 分の 1 瓦にあらずして 100 分の 1 瓦を用いたものであるから刺激的効果でなく、寧ろ養分の増加に依つて結果が増加したものであると論じたのである。

使用量に就いて著者の用いた量は 100 cc. の培養基中に 1/10,000 瓦に相當する供試物が添加されたのであつて、Warkman の記載する如く 1 cc. が 1/10,000 瓦含有するものを 100 cc. 用いたものではない、これは著者の原報に明かな所である。

只これに關しては著者の疑問視するものは、當時供試材料たる Harris Vitamin B は他に或る物質即ち "Bios" の如きものが含有するのではなからうかと懸念して (2) を附して置いたのである。

爾來 "Bios" に關する研究が鈴木其他 (1925)⁽³⁰⁾ の研究者に依つて明かにされ其分離法も稍や確實になつたので著者は前年用いた Harris Vitamin B (2) より更に "Bios" の如き物を分離しその分離したものについて *Azotobacter* に對する効果を確定しようとする實驗を進めてゐる。

若し極微量の "Bios" が該菌の發育を刺激し之に依つて窒素固定量が増加するとすれば間接に窒素固定に參與する物は "Bios" に依つて刺激されるものであると云はねばならぬ。

假りにこのものが酵素の如きものであるとすれば "Bios" はこの場合酵素の刺激劑たる役目をするものである。勿論

該物質が酵素の如きものであるかどうか、又は眞の刺激物は果して“Bio”であるか其他のものか云々、これも尙研究の餘地が多い。いつれ之等に関しては、他に窒素固定の機構に關する生理學研究と共に研究中であるから後日報告する機會があることを思ふ。

今本稿を終らんとする時に際して國際土壤學會議 Third Commission, Acting President である北米の Waksman D. A. より來狀して來る一九三〇年ロシアに於て開かるとる第三回國際土壤會議には Fixation of nitrogen by microorganisms and question of soil inoculation の問題が重要な議事項に屬するから、こゝで來た、こゝを附載して置く次第である。

引用文獻

1. Berthelot, H., Compt. Rend. Acad. Sci., 101 : 775, 1885.
2. Beijerinck, M. W., Centrbl. Bakt., 11, 7 : 591, 1901.
3. Winogradsky, S., Compt. Rend. Acad. Sci., 116 : 1385, 1893.
4. Löhnis, F. and Pillai, N. K., Centrbl. Bakt., 11, 20 : 781, 1908.
5. Hoffmann, C. and Hammer, R. W., Centrbl. Bakt., 11, 28 : 127, 1910.
6. Krainsky, A. V., Centrbl. Bakt., 11, 26 : 230, 1910.
7. Christensen, H. R., Centrbl. Bakt., 11, 17 : 109, 1907 ; 19, 735, 1907.
8. Greaves, J. F., Carter F. G., and Lund, Y., Soil Sci., 13 : 481, 1922.
9. Mockeridge, F. A., Biochem. Jour., 9 : 272, 1915.
10. Gainey, P. L., Science, N. S., 43 : 139, 1922.
11. Frost, E. B. and Davenport, A., Jour. Agri. Res., 14 : 517, 1918.

12. Johnson H. W., and Lipman, C. B., Univ. Cal. Publ. Agr. Sci., 4 : 397, 1922.
13. Yamagata, U. and Itano, A., Jour. Bact., 8: 521, 1923.
14. Remy, Th. and P. Rösing, G., Centrbl. Bakt., II, 30; 349, 1911.
15. Böhnigen, N. L., Centrbl. Bakt., II, 38:621, 1913.
16. Lipman, C. B. and Sharp, L. T., Bot. Gaz., 59; 4) 21 915.
17. Koch, A., Ber. deut. land. Gesell.; 22; 117, 1907.
18. Jones, D. M., Centrbl. Bakt., II. 38,14, 1913.
19. Kysner, E Compt. Rendr Acad. Sci., 171, 969, 1920.
20. Winogradsky, S., Compt. Rend. Acad. Sci., 116:1335, 1893.
21. Wieland, H, Ber. deut. chem. Gesell., 55:3639, 1922.
22. Gautier, A. and Drouin, R., Compt. Rend. Acad. Sci. 106; 754, 188.
23. Kostytschew, S., Ryskaltschuk, A. U. Schwezow, Hoppe Seyler's Zeit. Phys., 154: 1, 1926.
24. 廣川八郎, 阪本浩太郎 日本農藝化學會誌 第四卷七三十七頁 昭和三年
25. Bonnema, A., Centrbl. Bakt., II. 10; 598, 1903.
26. Czapek, F., Frget. Physiol., 1, 2; 633, 1903.
27. Loew, O. and Aso, K., Centrbl. Bakt., II, 22; 452, 1909.
28. Werkman, Jour., Bach. 1 :335, 1927.
29. Itano, A., Jour. Bact., 8:483, 1923.
30. 坂本文明, 平友恒 日本化學會誌 第四五卷 二九九頁 大正十四年